



ÚŘAD PRO VYNALEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

241494
(11) (B2)

[22] Přihlášeno 23 12 81

[21] (PV 9748-81)

[32] [31] [33] Právo přednosti od 23 12 80
(3095/80) Maďarská lidová republika

[40] Zveřejněno 13 06 85

[45] Vydáno 15 09 87

[51] Int. Cl.⁴
C 12 P 7/10
C 12 R 1/72

[72]

Autor vynálezu

NAGY GYULA dr. ing.; KEREKES RÓBERT dr.; SOMOGYI PÁL;
REZESSY JUDIT ing.; VAJDA BOLDIZSÁR dr., BUDAPEŠT [MLR]

[73]

Majitel patentu

JÓZSEF ATTILA MGTSZ ABONY [MLR]

(54) Způsob výroby krmných kvasnic a/nebo ethylalkoholu
z rostlinného materiálu

1

2

Řešení se týká způsobu výroby krmných kvasnic a/nebo ethylalkoholu z rostlinných odpadních látek, materiálu rostlinného původu, obsahujícího celulózu (např. i papíru) a zemědělských odpadů.

Podle řešení se odpady předem zpracovávají se zředěnou anorganickou kyselinou a/ nebo zředěným louhem za tepla a potom se fermentují o sobě známým způsobem kmenem *Candida utilis* var. *cellulolytica*, uloženým 23. září 1980 pod číslem CU 28 00199 v maďarské národní sbírce kmenů [OKI].

Jestliže se fermentace provádí za aerobních podmínek, tak vznikají krmné kvasnice, které se mohou po odfiltrování nebo přímo rozprášením sušit. Jestliže se fermentuje za anaerobních podmínek, tak vzniká ethylalkohol, zatímco fermentace za mohutného provětrávání (max. 1 mg O₂/l) vede k tomu, že vznikají současně krmné kvasnice a ethylalkohol.

Vynález se týká způsobu výroby krmných kvasnic a/nebo ethylalkoholu z rostlinného materiálu, jako jsou zemědělské užitkové rostliny a/nebo divoce rostoucí rostliny nebo jejich odpady a/nebo z průmyslového odpadu s obsahem celulózy.

Rostliny, přesněji 25 až 40 % sušiny rostlinných odpadních látek, sestávají z celulózy. Kromě toho obsahují ještě lignin v množství asi 20 až 40 % a menší množství polymerů, skládajících se z pentózových jednotek a polymerů, sestavených z hexózových jednotek, jakož i další anorganické a organické látky.

Pro zužitkování rostlin a rostlinných odpadů fermentací jsou známy dvě cesty. Jednou z nich je přímá fermentace celulózy pomocí mikroorganismů, rozkládajících celulózu, to jest celulolytických mikroorganismů.

Druhá možnost spočívá v tom, že se celulózy odbourávají kyselé nebo enzymaticky na glukózu a získaná glukóza se fermentuje.

Je pouze několik málo mikroorganismů, které se hodí k přímé fermentaci celulózy, ale i tyto organismy rozkládají celulózu jen velmi pomalu. Mikroorganismy rozkládající celulózu jsou například z bakterií druhu *Cellulomonas* a *Cellobacterium* a z kvasinek například *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma viride* atd.

Pro výrobu mikrobiální bílkoviny za použití mikroorganismů, rozkládajících celulózu byly provedeny Ch. E. Dunlapem (A. Chem. Soc. Symp. 1970) pokusy s kmeny *Cellulomonas* a *Alcaligenes*. F. Kargi a M. L. Schuler (Biotechn. and Bioeng. Vol. XXII, 1567—1600, 1980) experimentovali s mutací *Pseudomonas fluorescens*.

Pokusy, směřující k výrobě mikrobiální bílkoviny (Single Cell Protein, SCP) za pomoci bakterií a plísň ztratily pozvolna na významu, proto proti použití těchto mikroorganismů jako krmné bílkoviny byly z hlediska veterinární medicíny námítky.

Možností zužitkování celulózy fermentací jsou mnohem širší, jestliže se celulóza nejdříve hydrolyzuje na glukózu, neboť je stravitelná téměř pro všechny mikroorganismy.

Sholler a Thornes vypracovali jako první na rozhraní století způsob totální hydrolyzy celulózy. Při tomto způsobu se používaly anorganické kyseliny střední koncentrace při teplotách nad 100 °C. Způsob byl proto velmi nákladný z hlediska spotřeby energie a k jeho provedení byla nutná zařízení odolná vůči kyselinám a tlaku. Tento způsob byl sice později modernizován (bylo možné snížit koncentraci kyselin a tlak), avšak nové továrny, které pracují podle tohoto způsobu se již nestaví.

Od roku 1950 se provádí pokusy hydrolyzovat celulózu pomocí enzymu *Cellulázy*, vyrobené z hub (B. Hagerdal aj.: Biotechn. and Bioeng. XXII, 1515—1526 a 1527—1542,

1980). Pro hydrolyzu celulózy se všeobecně používá enzymatický systém *Trichoderma viride* (D. Sternberg, Biotechn. and Bioeng. No. 6,35—53, 1976).

Enzymatická hydrolyza celulózy je drahý způsob. Obecně se vyplatí jen tehdy, jestliže se roztok glukózy, získaný hydrolyzou, může dále zpracovat na drahý produkt.

Při vypracování způsobu podle vynálezu se vycházelo z toho, že se pro výrobu SCP mohou používat pouze mikroorganismy, které lze akceptovat pro účely krmiv pro zvířata a které kromě ligninu mohou zužítkovat širokou škálu rostlinných složek.

Species *utilis* patřící k druhům *Candida* a *Torulopsis* se používají po desetiletí jako krmné kvasnice. Tyto známé druhy kvasinek nemohou rozkládat ani lignin, ani celulózu. Ani v literatuře nebyl podnes popsán žádný druh kvasinek, který je schopen rozkládat celulózu.

Proti očekávání bylo zjištěno, že kmen *Candida utilis* izolovaný v roce 1978 genetickými metodami a metodami selektivními pro kmen je schopen odbourávat hydratovanou nebo částečně degradovanou celulózu. Pro hydrataci a degradaci celulózy byl vypracován jednoduchý způsob předúpravy, pomocí něhož lze vyrobit z materiálu, obsahujícího celulózu, živný roztok, vhodný pro uvedení kmen kvasinek.

Předmětem vynálezu je proto způsob výroby krmných kvasnic a/nebo ethylalkoholu z rostlinného materiálu, jako jsou zemědělské užitkové rostliny a/nebo divoce rostoucí rostliny nebo jejich odpady a/nebo z průmyslového odpadu s obsahem celulózy, jehož podstata spočívá v tom, že se rostliny a/nebo jejich odpady a/nebo průmyslové odpady s obsahem celulózy předběžně zpracují zředěnou anorganickou kyselinou v hmotnostní koncentraci 0,5 až 10,0 % a/nebo hydroxidem sodným v hmotnostní koncentraci 0,5 až 10,0 % při teplotě 80 až 100 stupňů Celsia po dobu 0,5 až 5,0 hodin a potom se provádí fermentace při teplotě 33 až 39 °C za aerobních nebo anaerobních podmínek kmenem *Candida utilis* var. *cellulolytica*, uloženým pod číslem CU 28 00199 v maďarské sbírce kmenů OKI.

Kmen CU 28 byl izolován z polního kmen. Asi 1 g zetlelého dřeva byl homogenizován s 9 ml sterilního fyziologického roztoku kuchyňské soli. Z roztoku byla připravena desítková zředovací řada, kterou byl očkovan *Sabouraudův* agar, obsahující CMC. (*Sabouraudův* agar, obsahující karboxymethylcelulózu odpovídá svým složením živnému médiu Oxoid CM 41 s tím rozdílem, že místo dextrózy obsahuje karboxymethylcelulózu.)

Desky byly inkubovány 72 hodin při 25,30, popřípadě 37 °C. Podle buněčně morfologických metod byly vybrány kultury kvasinek, vyrostlé na deskách a přeočkovány na živné médium, obsahující glukózu a

karboxymethylcelulózu, následujícího složení:

lojový extrakt (Beef-extrakt) (Difko)	5,0 g
glukóza	7,5 g
karboxymethylcelulóza	7,5 g
Bacto pepton (Difco)	4,0 g
kvasinkový extrakt (Oxoid L 21)	1,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný	0,2 g
hydrogenfosforečnan dvojdraselný	0,15 g
dihydrogenfosforečnan sodný	2,0 g
hydrogenfosforečnan dvojsodný	1,5 g
síran hořečnatý	0,3 g
síran zinečnatý	0,1 g
síran amonný	3,0 g
chlorid železitý	0,1 mg
síran měďnatý	0,6 mg
chlorid manganatý	0,15 mg
jodid draselný	0,05 mg
kyselina boritá	0,1 mg
agar—agar	15 g
voda	ad 1 litr

Obvyklými způsoby čištění byly kultivovány kultury, pocházející z jediné buňky a uchovávány na živném médiu, obsahujícím glukózu a karboxymethylcelulózu. Z těchto izolátů byly vybrány ty kultury, které nejlépe odbourávaly karboxymethylcelulózu.

Synchronní kultura tohoto kmene byla podrobena v roce 1978 mutagennímu zpracování, a sice byla použita koncentrace N-methyl-N-nitroso-N'-nitroguanidinu, při které počet živých zárodků klesl minimálně o tři řády. Buňky, které přežily, byly segregovány v živném médiu, obsahujícím karboxymethylcelulózu a přeočkovány na pevnou

Sabouraudovu živnou půdu, obsahující CMC. Aktivita cellulázy (tj. schopnost rozkládat celulózu) získaných kolonií mutantů, byla určována pomocí dinitrosalicylové kyseliny a byl vybrán kmen s největší aktivitou cellulázy (*Candida utilis* var. *cellulolytica*) a uložen pod číslem 00 199 v národní sbírce mikroorganismů zemského ústavu pro zdravotnictví (Országos Közegészségügyi Intézet Mikroorganizmusok Nezmeti Gyűjteménye).

Buňky uvedeného kmene mají tvar elipsoidu, malý průměr se pohybuje mezi 2,5 až 4,5 μm , velký průměr mezi 4,5 až 7,5 μm . Kmen tvoří bílé, konvexní kolonie s lesklým povrchem a hladkými okraji.

Pro hydrataci a částečnou degradaci se celulóza zpracovává zředěnou anorganickou kyselinou a/nebo zředěným louhem při teplotách mezi 80 až 100 °C, v závislosti na druhu rostlinného odpadu 0,5 až 5 hodin. Koncentrace kyseliny a louhu činí 0,5 až 10 % hmot.

Optimální koncentrace a optimální teplota a doba trvání předúpravy se určuje jednotlivě pro každý případ v závislosti na chemickém složení a struktuře rostlinného odpadu.

V závislosti na druhu rostlinného odpadu se může biokonverzí přeměnit minimálně 25 až 60 % na krmné kvasnice, popřípadě ethylalkohol. Dále je uvedeno srovnání kmene *Torulopsis utilis*, obvyklého pro výrobu krmných kvasnic a kmene *Candida utilis* var. *cellulolytica*, používaného podle vynálezu. V tabulce jsou uvedena množství sušených krmných kvasnic, která lze získat ze 100 kg suché suroviny a množství ethylalkoholu ve ° hl, která lze získat ze 100 kg suché suroviny (vyjádřený výtěžek v litru absolutního alkoholu).

východí látka a produkt

	Candida utilis var. cellulolytica	výtěžek Torulopsis utilis
krmné kvasnice ze slámy	9,6—11,2	6,4— 7,8
ethylalkohol ze slámy	12,0—13,0	8,2— 9,4
krmné kvasnice z novinového papíru	13,2—14,0	8,6— 9,2
ethylalkohol z novinového papíru	13,6—14,0	8,6— 9,2
krmné kvasnice z kenafy	16,0—18,0	9,2—10,0
ethylalkohol z kenafy	20,0—22,0	11,4—12,2
krmné kvasnice a ethylalkohol z kenafy	9,0—10,0	4,0— 5,0
krmné kvasnice ze směsi, připravené v poměru 75 : 25, odpadu cukrové třtiny a bagasy	18,0—19,0	9,8—10,6
ethylalkohol ze směsi, připravené v poměru 75 : 25, odpadu cukrové třtiny a bagasy	22,0—23,6	12,2—13,6

Kenafa je vláknitá rostlina, bagasa je zbytek, zbývající po vylisování cukrové třtiny.

Vynález bude blíže vysvětlen pomocí následujících příkladů, aniž by byl ale na tyto příklady omezen.

Příklad 1

1 000 dílů hmotnostních kenafy se rozele v kladivovém mlýně na velikost částic 1 až 2 mm. K materiálu se přidá 9 000 dílů hmot. 3,2% kyseliny sírové a směs se zpracovává tepelně při 96 °C po dobu 120 minut v nádrži, odolné vůči kyselinám. Potom se přidá 7,2 dílů hmot. superfosfátu a 4,0 dílů hmot. technického síranu amonného a rozpustí se. Roztok se odstředí, jeho pH se nastaví technickým hydroxidem sodným na hodnotu 6,5. Živný roztok, vyrobený tímto způsobem, se ochladí na 37 °C a inokuluje se v poměru 1 : 100 předkulturou *Candida utilis* var. *cellulolytica*, obsahující na mililitr 10^8 buněk.

Předkultura se vyrobí následovně:

glukóza	7,5 g
karboxymethylcelulóza (rozpustná ve vodě)	7,5 g
dihydrogenfosforečnan draselný	0,2 g
hydrogenfosforečnan dvoj- draselný	0,15 g
dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát	2,0 g
hydrogenfosforečnan dvojsodný	1,5 g
síran hořečnatý heptahydrát	0,3 g
síran zinečnatý	0,1 g
síran amonný	3,0 g
lojový extrakt (Beef extract) (Difco)	5,0 g
Bacto pepton	4,0 g
kvasinkový extrakt (Oxoid L 21)	1,0 g
chlorid železitý hexahydrát	0,1 mg
síran měďnatý pentahydrát	0,6 mg
chlorid manganatý tetrahydrát	0,15 mg
jodid draselný	0,05 mg
kyselina boritá	0,1 mg

se rozpustí v litru destilované vody. Roztok se sterilizuje jednu hodinu při 105 °C v baňce uzavřené vatovou zátkou. Živný roztok se očkuje při 37 °C 10 ml suspenze *Candida utilis* var. *cellulolytica*, staré 24 hodin a potom se inkubuje při 37 °C. Živný roztok hlavní kultury se očkuje suspenzí, obsahující na ml 10^8 buněk.

Fermentace se provádí za provětrávání přebytkem kyslíku v množství 1 až 2 mg O_2 /l. V případě diskontinuální fermentace trvá fermentace 36 až 40 hodin. Na konci fermentace (po dosažení maximálního počtu zárodků) mohou se kvasnice odfiltrovat na vakuovém bubnovém filtru nebo filtračním lisu nebo se ale také mohou přímo sušit práškováním.

Ze 100 kg kenafy lze získat popsáním

způsobem 16 až 18 kg sušených krmných kvasnic.

Příklad 2

Pracuje se stejným způsobem jako v příkladě 1 s tím rozdílem, že se fermentuje za anaerobních podmínek bez provětrávání. Fermentace trvá 46 až 50 hodin. Množství alkoholu, které lze oddestilovat z fermentační břečky činí — přepočteno na absolutní alkohol — 20,0 až 22,0 litrů.

Příklad 3

Pracuje se stejným způsobem jako v příkladě 1, avšak jako suroviny se místo kenafy použije sláma. Předúprava se provádí 3,7% kyselinou sírovou při 98 °C po dobu 38 minut. Po filtraci se zbytek zpracovává při 98 °C po dobu 42 minut 2,8% hydroxidem sodným. Jak kyselina, tak i hydroxid se používají v množství 4 500 dílů hmot. Fermentace se při pH 6,3 provádí 46 hodin. Ze 100 kg suché slámy se získá 9,6 až 11,2 kg suchých krmných kvasnic.

Příklad 4

Pracuje se způsobem popsaným v příkladě 3 s tím rozdílem, že se fermentuje bez provětrávání, za anaerobních podmínek. Po 52hodinové fermentaci se břečka kultury destiluje. Ze 100 kg slámy se získá, přepočteno na absolutní alkohol, 12 až 13 litrů alkoholu.

Příklad 5

Pracuje se stejně jako v příkladě 1, avšak místo kenafy se použije jako výchozí látka novinový papír. Tento se podrobí předúpravě 3,6% hydroxidem sodným při teplotě 98 stupňů Celsia a po dobu 68 minut. Fermentace trvá 54 hodin. Ze 100 kg novinového papíru se získá 13,2 až 14,0 kg suchých krmných kvasnic.

Příklad 6

Pracuje se způsobem, popsaným v příkladě 5 s tím rozdílem, že se fermentace provádí bez provětrávání, za anaerobních podmínek. Po 60 hodinách fermentace se může získat ze 100 kg novinového papíru alkohol v množství 13,6 až 14,0 litrů [abs.].

Příklad 7

Pracuje se stejně jako v příkladě 1 s tím rozdílem, že se jako výchozí látka použije směs, sestávající ze 75 dílů zbytků po sklizni cukrové třtiny a 25 dílů bagasy. Předúprava se provádí 2,8% kyselinou sírovou při 96 °C po dobu 150 minut. Fermentace trvá 40 až 44 hodin. Ze 100 kg uvedené směsi

lze vyrobit 18 až 19 kg suchých krmných kvasnic.

Příklad 8

Pracuje se způsobem popsaným v příkladě 7 s tím rozdílem, že se fermentace provádí za anaerobních podmínek, bez provětrávání. Fermentace trvá 50 až 56 hodin. Ze 100 kg výchozího materiálu je možné vy-

robit 22,0 až 23,6 litrů absolutního alkoholu.

Příklad 9

Pracuje se způsobem popsaným v příkladě 1, avšak kultura se provětrává přebytkem kyslíku, a to 0,2 mg/l.

V tomto případě se ze 100 kg kenafy získá 9 až 10 kg suchých krmných kvasnic a 8 až 10 litrů absolutního ethylalkoholu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby krmných kvasnic a/nebo ethylalkoholu z rostlinného materiálu jako jsou zemědělské užitkové rostliny a/nebo divoce rostoucí rostliny nebo jejich odpady a/nebo z průmyslového odpadu s obsahem celulózy, vyznačující se tím, že se rostliny a/nebo jejich odpady a/nebo průmyslové odpady s obsahem celulózy předběžně zpracují zředěnou anorganickou kyselinou v hmotnostní koncentraci 0,5 až 10,0 % a/nebo hydroxidem sodným v hmotnostní koncentraci 0,5 až 10,0 % při teplotě 80 až 100 °C po dobu 0,5 až 5,0 hodin a potom se provádí fermentace při teplotě 33 až 39 °C za aerobních nebo anaerobních podmínek kmenem *Candida utilis* var. *cellulolytica*, uloženým pod číslem CU 28 00199 v maďarské národní sbírce kmenů OKI.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se předběžné zpracování provádí zředěnou anorganickou kyselinou v hmotnostní koncentraci 0,5 až 4,0 % a/nebo hydroxidem sodným v hmotnostní koncentraci 0,5 až 4,0 %.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se předběžné zpracování provádí při teplotě 90 až 98 °C.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se

tím, že se předběžné zpracování provádí po dobu 0,5 až 3,0 hodiny.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se fermentace provádí při teplotě 35 až 37 °C.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se fermentace provádí diskontinuálně nebo kontinuálně.

7. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že v případě diskontinuální fermentace činí doba fermentace v závislosti na výchozím materiálu 16 až 72 hodin, s výhodou 16 až 50 hodin.

8. Způsob podle bodů 1 až 7, vyznačující se tím, že se pro výrobu krmných kvasnic fermentace provádí při obsahu volného kyslíku ve fermentační břečce 1,0 až 4,0 mg O₂/l, s výhodou 1,5 až 2,5 mg O₂/l fermentační břečky.

9. Způsob podle bodů 1 až 8, vyznačující se tím, že se pro výrobu ethylalkoholu provádí fermentace za anaerobních podmínek.

10. Způsob podle bodů 1 až 9, vyznačující se tím, že se fermentační břečka při současně výrobě krmných kvasnic a ethylalkoholu provětrává pro udržení obsahu volného kyslíku na hodnotách do 1 mg O₂/l fermentační břečky.